

# HPLC 测定不同产地泽兰药材中齐墩果酸和熊果酸含量

姚静\*

(河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000)

**[摘要]** 目的:建立泽兰药材中齐墩果酸和熊果酸的含量测定方法,并对收集自不同产地(海拔15~2750 m)的泽兰药材进行含量测定,寻找海拔高度与药材质量的关系。方法:采用 AgilentTC C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相甲醇-乙腈-0.2%冰乙酸(78:10:12),流速0.8 mL·min<sup>-1</sup>,在210 nm处检测,柱温40℃。结果:齐墩果酸和熊果酸的线性范围分别为0.164~2.46, 0.325~4.884 μg,回归方程分别为 $Y = 5.025 \times 10^5 X + 2.106 \times 10^3$  ( $r = 0.9998$ )和 $Y = 4.655 \times 10^5 X + 1.013 \times 10^4$  ( $r = 0.9998$ ),平均加样回收率分别为99.03% (RSD 1.7%)和98.83% (RSD 1.4%)。海拔高度与药材质量呈现一定的正相关性,即海拔越高,泽兰药材中齐墩果酸和熊果酸含量也越高。结论:所建立的含量测定方法简便快速、准确可靠,可用于评价泽兰药材的质量。海拔高度与药材质量的关系可指导泽兰药材种植区域的优选。

**[关键词]** 泽兰; 齐墩果酸; 熊果酸; 高效液相色谱法; 不同产地

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0080-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100080

## Determination of Oleanolic Acid and Ursolic Acid in Lycopi Herba from Different Regions by HPLC

YAO Jing\* (Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To set up a content determination method for oleanolic acid and ursolic acid in Lycopi Herba by HPLC, and to find the relationship between altitude and medicinal material content. **Method:** AgilentTC C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was selected, the mobile phase was methanol-acetonitrile-0.2% glacial acetic acid solution (78:10:12), the flow rate was 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature performed at 40℃, and the target component was detected at 210 nm. **Result:** Oleanolic acid showed a linear ranges at 0.164-2.46 μg ( $r = 0.9998$ ) and ursolic acid was 0.325-4.884 μg ( $r = 0.9998$ ). The average recovery of the added sample were 99.03% (RSD 1.7%) and 98.83% (RSD 1.4%), respectively. Altitude and herbal content showed a certain degree of positive correlation. **Conclusion:** The method is simple and rapid, accurate and reliable, therefore available for the elevation of Lycopi Herba. Relationship between altitude and quality can be a preferably guidance for planting area.

**[Key words]** Herba Lycopi; oleanolic acid; ursolic acid; HPLC; different habitat

泽兰又称为方梗泽兰、地笋、甘露子等<sup>[1-2]</sup>,最早收载于《神农本草经》。其性微温,味辛、苦,具有调经、活血祛瘀、利水消痈等功效,可用于月经不调,产后瘀血、腹痛,水肿,疮痈肿毒等的治疗<sup>[3]</sup>。现在临床中多将泽兰与其他药味组方,用于急性黄疸型肝炎、湿热型慢性肝炎的治疗<sup>[4]</sup>,而研究表明,三萜类成分齐墩果酸、熊果酸能降低谷丙转氨酶和血清转氨酶等,正是泽兰治疗肝炎的起效物质<sup>[5-6]</sup>。考虑到《中国药典》2010年版泽兰尚无含量测定指标,

因此为了更好地控制药材质量,本研究建立 HPLC 测定泽兰中齐墩果酸和熊果酸的方法,并对收集自不同产地(海拔15~2750 m)的药材进行含量测定,以期找到泽兰药材质量和海拔高度之间的关系。

### 1 材料

**1.1 仪器** 1260 系列高效液相色谱仪(包括 G1314B 检测器, G1311C 四元泵, G1316A 柱温箱, G2170BA 工作站安捷伦), UV-5500 型紫外-可见分

[收稿日期] 20141229(253)

[通讯作者] \*姚静,高级工程师,从事中药制剂、中药新药研究与开发, Tel:13613821146, E-mail:1684473240@qq.com

光度计(上海元析仪器有限公司),FA1204B型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司),Millipore Simplicity型超纯水器(Millipore公司),KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山舒美超声仪器有限公司)。

**1.2 试药** 齐墩果酸和熊果酸对照品(批号110709-201206,110742-201220)均购自中国食品药品检定研究院;泽兰药材分别收集自甘肃陇南、陕西榆林、陕西安康、河北安国、云南曲靖、四川凉山、吉林通化、辽宁西丰、福建宁德、广东德庆10个产地,经河南中医学院董诚明教授鉴定为唇形科植物毛叶地瓜儿苗 *Lycopus lucidus* var. *hirtus* 的干燥地上部分;甲醇、乙腈、冰乙酸均为色谱纯(Fisher公司),水为超纯水(自制),其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件<sup>[7]</sup>** 采用 Agilent TC C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-乙腈-0.2%冰乙酸(78:10:12),流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 210 nm,柱温 40 °C,样量 10 μL。

### 2.2 溶液制备

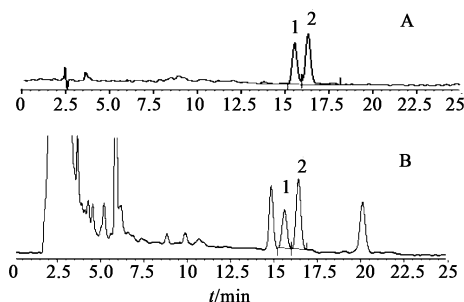
**2.2.1 对照品溶液** 分别取齐墩果酸和熊果酸对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并制成齐墩果酸和熊果酸分别为 0.082, 0.162 8 g·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液** 取泽兰药材粉末(过50目筛)约2g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50mL,密塞,称定质量,超声处理30min,取出放至室温,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液5mL,水浴蒸干,残渣加甲醇溶解并定容至2mL量瓶中,摇匀,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 系统适应性试验** 按 2.2.1 项下方法制备对照品溶液,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,分别进样 10 μL,按 2.1 项下色谱条件进行测定,采集 HPLC 图谱。结果供试品图谱中,齐墩果酸和熊果酸保留时间与对照品图谱中一致,两成分分离度良好,其余色谱峰对目标成分测定无干扰。结果见图 1。

**2.3.2 线性关系考察** 按 2.2.1 项下方法制备对照品溶液,分别进样 2, 5, 10, 20, 30, 50 μL,按 2.1 项下色谱条件进行测定。以齐墩果酸和熊果酸的进样量(μg)为横坐标 X,对应峰面积的积分值为纵坐标 Y,分别绘制标准曲线,齐墩果酸和熊果酸的回归方程分别为  $Y = 5.025 \times 10^5 X + 2.106 \times 10^3$  ( $r =$



A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 齐墩果酸; 2. 熊果酸

图1 泽兰供试品 HPLC

Fig.1 HPLC spectrum of Lycopi Herba

0.999 8),  $Y = 4.655 \times 10^5 X + 1.013 \times 10^4$  ( $r = 0.999 8$ )。结果表明,齐墩果酸和熊果酸的进样量分别在 0.164 ~ 2.46, 0.325 6 ~ 4.884 μg 内具有较好的线性关系。

**2.3.3 精密度试验** 取 2.2.1 项下的对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果齐墩果酸和熊果酸的峰面积 RSD 分别为 0.8%, 0.8%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.4 重复性试验** 取泽兰药材(产地甘肃陇南),按 2.2.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按 2.1 项下色谱条件进行测定。结果泽兰药材中齐墩果酸和熊果酸的平均质量分数分别为 1.132, 1.871 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 分别为 1.9%, 1.8%, 数据表明该含量测定方法重复性较好。

**2.3.5 稳定性试验** 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件分别于制备后的 0, 1, 3, 6, 9, 12 h 测定,结果齐墩果酸、熊果酸峰面积的 RSD 均为 1.0%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

**2.3.6 加样回收率试验** 取泽兰药材粉末(产地甘肃陇南,含齐墩果酸 1.132 mg·g<sup>-1</sup>,熊果酸 1.871 mg·g<sup>-1</sup>)约 1 g,精密称定,平行 6 份,置具塞锥形瓶中,分别精密加入混合对照品溶液(齐墩果酸 0.112 8 g·L<sup>-1</sup>,熊果酸 0.187 4 g·L<sup>-1</sup>) 10 mL 和甲醇 40 mL,密塞,称定质量,按 2.2.2 项下方法进行,制得供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,计算加样回收率,结果见表 1。

**2.4 样品含量测定** 取收集自不同地区的泽兰药材,按 2.2.2 项下方法制得供试品溶液,并按 2.1 项下色谱条件进行测定,按外标法计算齐墩果酸和熊果酸的含量,结果见表 2。

## 3 讨论

试验过程中对流动相、流速和柱温等条件进行

表 1 泽兰样品中加样回收率试验

Table 1 Results of addition recoveries of Lycopi Herba

| 成分   | 样品中量<br>/mg | 加入量<br>/mg | 测得量<br>/mg | 回收率<br>/% | 平均值<br>/% | RSD<br>/% |
|------|-------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 齐墩果酸 | 1.134 6     | 1.128      | 2.244 6    | 98.40     | 99.03     | 1.7       |
|      | 1.130 8     | 1.128      | 2.244 3    | 98.71     |           |           |
|      | 1.174 0     | 1.128      | 2.295 3    | 99.41     |           |           |
|      | 1.132 9     | 1.128      | 2.284 7    | 102.11    |           |           |
|      | 1.120 0     | 1.128      | 2.219 8    | 97.50     |           |           |
| 熊果酸  | 1.147 5     | 1.128      | 2.253 5    | 98.05     |           |           |
|      | 1.875 3     | 1.874      | 3.715 8    | 98.21     | 98.83     | 1.4       |
|      | 1.868 9     | 1.874      | 3.702 3    | 97.83     |           |           |
|      | 1.940 4     | 1.874      | 3.801 3    | 99.30     |           |           |
|      | 1.872 5     | 1.874      | 3.775 0    | 101.52    |           |           |
|      | 1.851 2     | 1.874      | 3.687 5    | 97.99     |           |           |
|      | 1.896 6     | 1.874      | 3.735 8    | 98.14     |           |           |

表 2 泽兰样品中 2 种成分的含量测定

Table 2 Results of Lycopi Herba sample determination

| 产地   | 平均海拔/m | 齐墩果酸/mg·g <sup>-1</sup> | 熊果酸/mg·g <sup>-1</sup> |
|------|--------|-------------------------|------------------------|
| 甘肃陇南 | 1 000  | 1.130                   | 1.869                  |
| 陕西榆林 | 1 100  | 1.263                   | 1.112                  |
| 陕西安康 | 1 900  | 2.511                   | 2.843                  |
| 河北安国 | 24     | 0.777                   | 0.971                  |
| 云南曲靖 | 2 000  | 2.037                   | 2.445                  |
| 四川凉山 | 2 750  | 2.126                   | 3.067                  |
| 吉林通化 | 850    | 0.936                   | 0.824                  |
| 辽宁西丰 | 374    | 0.625                   | 1.147                  |
| 福建宁德 | 15     | 0.554                   | 0.792                  |
| 广东德庆 | 120    | 1.273                   | 0.863                  |

了考察,通过对比冰乙酸、磷酸、乙酸胺、四丁基溴化铵发现<sup>[8]</sup>,使用冰乙酸的峰型对称度最好,又对 0.1%、0.2%、0.5%、1% 冰乙酸进行考察,0.2% 扫尾效果较 0.1% 好,0.2% 以上对效果没有提升,且酸度越高对色谱柱的损害越大<sup>[9]</sup>,因此选择 0.2% 的冰乙酸作为扫尾剂;试验中发现,当流速将至 0.5 mL·min<sup>-1</sup> 时,峰型变宽导致分离度降低,综合考虑,选择流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,为补偿降低流速导致的峰型变宽,将柱温提升至 40 ℃。

齐墩果酸和熊果酸在紫外光区仅有微弱的末端吸收,两成分的最大吸收波长为 206 nm<sup>[10]</sup>,但此波长处基线噪音过大,对目标峰造成了干扰。210 nm 既保证了检测的准确性和灵敏度,又有效避免了

基线噪音,因此选择 210 nm 作为检测波长。

泽兰主要分布于东北、华北、西南等地,对收集自甘肃陇南、陕西榆林等 10 地(海拔分布 15~2 750 m)的泽兰药材进行测定,结果齐墩果酸和熊果酸的含量分别为 1.32、1.59 mg·g<sup>-1</sup>,两种成分的含量整体呈现出同高同低的现象。齐墩果酸、熊果酸含量与产地海拔呈现出一定的正相关性,即海拔越高,含量越高,海拔达 2 750 m 的四川凉山所产药材含量是福建宁德的近 4 倍,云南曲靖(海拔 2 000 m)所产泽兰药材的含量是河北安国(海拔 24 m)的近 3 倍,即使同样产自陕西,安康(海拔 1 900 m)的药材质量也好过榆林(海拔 1 100 m)。此种现象,推断为因海拔不同,导致温度、光照强度、含氧量等存在差异,上述与药材生长相关条件的差异共同促成了药材质量的高低<sup>[11]</sup>。

[参考文献]

- [1] 汪文杰,王玲.海拔高度对茅苍术结实率和种子质量影响的调查研究[J].湖北中医药大学学报,2012,14(6):47-48.
- [2] 刘君.泽兰的化学成分及药理研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2008,10(1):23-24.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:212.
- [4] 杨学猛,徐凤梅.HPLC 法测定泽兰中熊果酸、齐墩果酸的含量[J].中草药,2003,34(10):108,128.
- [5] 王涛,李超,濮社班,等.泽兰的化学成分研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(5):83-85.
- [6] 相延英,杨光.常用中药中齐墩果酸和熊果酸的含量测定[J].中国医院药学杂志,2004,24(5):61-63.
- [7] 张汶婕,管大平,钱世兵,等.HPLC 测定左归丸中齐墩果酸与熊果酸含量[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(5):92-94.
- [8] 王明娟,李娅萍,胡昌勤.药品质量标准中色谱柱等因素影响分析结果的实例揭示[J].药物分析杂志,2008,28(11):1940-1944.
- [9] 林兰,程奇蕾,宁保明,等.浅谈分析实验室高效液相色谱柱的管理[J].中国药师,2014,17(11):1972-1973.
- [10] 张俊清,陈文芝,蒋德锡,等.RP-HPLC 法测定角花胡颓子中齐墩果酸与熊果酸的含量[J].药物分析杂志,2010,30(7):1305-1307.
- [11] 郭东艳,王幸,覃鸿恩,等.不同海拔不同生长时期湖北海棠的质量分析[J].中药材,2013,36(8):1238-1240.

[责任编辑 顾雪竹]